



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ESTÁGIO SUPERVISIONADO II (QMC 5512)



Preparação do Alcanoatos de Benzila com Lipases Imobilizadas em Filme de Dextrana/PVA

André Possamai Rosso.

Orientadora: Prof. Dr. Maria da Graça Nascimento

Florianópolis, novembro de 2008

“Os ventos que às vezes tira algo que amamos, são os mesmos que trazem algo que aprendemos a amar... Por isso não podemos chorar pelo que foi nos tirado e sim, aprender a amar o que nos foi dado. Pois tudo aquilo que é realmente nosso, nunca se vai para sempre...”

Bob Marley

AGRADECIMENTOS

Essa dedicação vai para todos aqueles que de alguma forma contribuíram para eu estar aqui.

- Agradeço a Deus por fazer de mim uma pessoa muito feliz, por colocar pessoas maravilhosas em minha vida, por conhecer pessoas incríveis e que de alguma maneira mesmo distante estão aqui, guardadas em meu coração.

- À minha família por depositar tanta confiança, proteção, carinho, amor. Aos meus pais, Amílto e Dilma, minha irmã Karoline, meu cunhado Lazaro e minha sobrinha Hannah, essa vitória é para vocês meus amores.

- A minha orientadora, Prof. Dra. Maria da Graça Nascimento por ter sido uma pessoa presente, por me receber de portas abertas e por toda sua dedicação em ensinar, apoiar e brigar quando preciso.

- Aos meus grandes amigos de faculdade, Clito (Clitinho), Fernando (Ramonera), Julio (Julinho), Fábio (Murcilha) e a uma pessoa especial que apareceu na hora certa em minha vida... “amigo a gente guarda pra sempre no coração”

- Aos amigos do laboratório de biocatálise, Cris, Damis, Flá, Geovanni, Isa, Marcelo, Thiago, Vanessa, Simone e Zana, por toda amizade e ajuda.

- A Universidade Federal de Santa Catarina, pelo espaço físico fornecido.

- Ao CNPq e CAPES, pelo suporte e apoio financeiro.

- A AMANO, pela doação das enzimas.

- A Central de Análises do DQ-UFSC, pelas várias análises realizadas

- A todos os Professores do Curso de Química da UFSC.

ÍNDICE GERAL

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| ÍNDICE GERAL..... | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | v |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | vii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | viii |
| RESUMO..... | ix |
| 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 2 |
| 2.1. Enzimas..... | 2 |
| 2.2. Classificação das enzimas..... | 3 |
| 2.3. Lipases..... | 4 |
| 2.4. Imobilização de enzimas..... | 7 |
| 2.5. Dextranas..... | 10 |
| 2.6. PVA [álcool (polivinílico)]..... | 10 |
| 3. OBJETIVOS..... | 12 |
| 3.1. Objetivos Gerais..... | 12 |
| 3.2. Objetivos Específicos..... | 12 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS..... | 13 |
| 4.1. Reagentes, Solventes e Enzimas..... | 13 |
| 4.2. Equipamentos..... | 13 |
| 4.3. Preparação das blendas de DEX/PVA com e sem enzima..... | 14 |
| 4.4. Preparação do meio reacional para as reações de transesterificação e esterificação..... | 15 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 18 |
| 5.1. Preparação e caracterização dos suportes..... | 18 |
| 5.1.1. Preparação do filme de DEX/PVA..... | 18 |
| 5.1.2. Efeito do solvente orgânico no filme de DEX/PVA/Plastificante..... | 20 |
| 5.1.3. Determinação do teor de água..... | 21 |
| 5.2. Preparação do acetato de benzila catalisada por lipases..... | 22 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.1. Influencia da imobilização de diversas lipases em filmes de DEX/PVA/S e DEX/PVA/G..... | 25 |
| 5.2.2. Reutilização das blendas de DEX/PVA/S e DEX/PVA/G..... | 26 |
| 5.2.3. Efeito da massa de lipase..... | 28 |
| 5.2.4. Efeito da influencia do solvente..... | 29 |
| 5.2.5. Efeito do tamanho da cadeia alquílica para obtenção dos Alcanoatos de benzila..... | 31 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 33 |
| 7. PERSPECTIVAS..... | 34 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 35 |
| 9. ANEXOS..... | 37 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Representações gráficas das estruturas tridimensional de uma enzima..... | 2 |
| Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática..... | 4 |
| Figura 3. Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Cândida antarctica</i> obtida por raio-X..... | 5 |
| Figura 4. Mecanismo proposto para a hidrólise enzimática de um éster..... | 6 |
| Figura 5. Preparação enzimática do laurato de <i>n</i> -hexila catalisada pela lipase Lipozyme IM-77..... | 6 |
| Figura 6. Principais métodos de imobilização de enzimas..... | 8 |
| Figura 7. Representação esquemática para a imobilização de LCR Em misturas de polímeros em PVA/PTFE..... | 9 |
| Figura 8. Estrutura monomérica da dextrana..... | 10 |
| Figura 9. Estrutura monomérica do PVA..... | 11 |
| Figura 10. Estrutura da venlafaxina..... | 11 |
| Figura 11. Preparação do filme de DEX/PVA e imobilização das lipases..... | 14 |
| Figura 12. Agitador com banho termostatizado da Technal TE-0532..... | 15 |
| Figura 13. Preparação do meio reacional e análise do produto..... | 16 |
| Figura 14. Espectro de RMN ¹ H de uma alíquota da reação de esterificação do acetato de vinila com álcool benzílico, conversão 53% [DEX/PVA/Sorb, LPS 50mg, <i>n</i> -hexano, 35°C, 72h (400MHZ, CDCl ₃)]..... | 17 |
| Figura 15. Titulador 633 Automático Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau..... | 21 |
| Figura 16. Preparação do acetato de benzila, via transesterificação..... | 23 |
| Figura 17. Espectro de RMN- ¹ H do acetato de vinila, após purificação em cc. Conv. 95,1%. [DEX/PVA/ 50mg LPS, <i>n</i> -hexano, 35°C, 72h (400MHZ, CDCl ₃)]..... | 24 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 18. Cromatografia em coluna..... | 24 |
| Figura 19. Espectro de IV do acetato de benzila purificado (filme)..... | 25 |
| Figura 20. Conversão do acetato de benzila em função da reuti- lização dos filmes após 30 dias, utilizando como catalisador o sistema DEX/PVA/S/Lipases, [<i>n</i> - hexano, 72h, 35°C, 50mg de lipases]..... | 27 |
| Figura 21. Conversão do acetato de benzila em função da reuti- lização dos filmes após 30 dias, utilizando como catalisador o sistema DEX/PVA/G/Lipases, [<i>n</i> -hexano, 72h, 35°C, 50mg de lipases]..... | 28 |
| Figura 22. Conversão em acetato de benzila em função da massa de LPS (-■-) e LRO (-●-) imobilizadas em filmes de DEX/PVA/S, <i>n</i> -hexano, 35°C..... | 29 |
| Figura 23. Conversão dos alcenoatos de benzila em função do tamanho da cadeia alquílica dos doadores acilas utilizando como catalisador LPS/DEX/PVA/S. [LPS 50mg, 35°C, 72h, <i>n</i> - hexano]..... | 31 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM..... | 3 |
| Tabela 2. Influência da massa de dextrana e PVA na formação do filme..... | 18 |
| Tabela 3. Influência da massa de dextrana, PVA e plastificantes na formação do filme..... | 19 |
| Tabela 4. Determinação do teor de água nas blendas de DEX/PVA/plastificante..... | 21 |
| Tabela 5. Conversão do acetato de benzila utilizando diferentes lipases imobilizadas..... | 26 |
| Tabela 6. Efeito do solvente orgânico na conversão do acetato de benzila catalisada pelo sistema DEX/PVA/S/LPS..... | 30 |

LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS

cc = cromatografia em coluna

ccd = cromatografia camada delgada

col = colaboradores

DEX = dextrana

G = glicerol

IV = infravermelho

LAY = lipase de *Cândida rugosa*

LAN = lipase de *Aspergillus níger*

LMJ = lipase de *Mucor javanicus*

LPS = lipase de *Pseudomonas* sp

LPS-IM = lipase de *Pseudomonas* sp imobilizada em terra diatomácea

LRO = lipase de *Rhizopus oryzae*

log P= logaritmo do coeficiente de partição

PVA = poli(álcool vinílico)

RMN-¹H = ressonância magnética nuclear de próton

S = sorbitol

RESUMO

Enzimas são catalisadores de origem protéica que atuam em condições ótimas de temperatura e pH acelerando as reações químicas. As enzimas podem ser imobilizadas em vários suportes, e assim serem utilizadas em síntese orgânica.

Inicialmente, foram preparados filmes com dextrana (DEX), álcool poli-vinílico (PVA) e plastificantes (glicerol, G ou sorbitol, S).

Utilizaram-se diversas massas dos polímeros e plastificantes para obter a composição mais adequada para a imobilização das lipases. Obteve-se um filme maleável com 0,2g DEX, 0,8g PVA e 0,2g de glicerol ou sorbitol, dissolvidos em 20 mL de H₂O.

Foi determinado o teor de água nos filmes de DEX/PVA/S ou DEX/PVA/G através do método de titulação de Karl-Fischer, com ou sem enzima, e estes apresentaram de 7-13% de água, sendo considerados adequados.

Lipases de *Candida rugosa* (LAY), *Mucor javanicus* (LMJ), *Pseudomonas* sp (LPS), *Rhizopus oryzae* (LRO), *Aspergillus niger* (LAN) e *Pseudomonas*-sp (LPS-IM) foram imobilizadas em filme DEX/PVA/S ou DEX/PVA/G, e estes sistemas utilizados como catalisadores nas reações de transesterificação do acetato de vinila com o álcool benzílico. Outros parâmetros avaliados foram a massa de LPS, solvente orgânico, reutilização do suporte e influência da cadeia alquílica na obtenção de alcenoatos de benzila.

As conversões em acetatos de benzila variaram de acordo com o sistema biocatalítico utilizado. A maior conversão obtida em éster foi de 95% com o sistema DEX/PVA/S/LPS.

A conversão em acetato de benzila foi dependente da polaridade do solvente orgânico exceto em acetonitrila, e variaram de 42-95%. As conversões em alcenoatos de benzila foram dependentes do aumento da cadeia alquílica do ácido. As maiores e menores conversões foram obtidas na esterificação dos ácidos hexanóico e palmítico, sendo de 91% e 30% em 72h, com o sistema DEX/PVA/S/LPS.

A reutilização dos sistemas DEX/PVA/lipases mostrou-se um processo vantajoso podendo ser utilizado após a estocagem sem a perda considerável da atividade, formando o acetato de benzila com conversões de 12-94%, dependendo da procedência da lipase.

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os filmes de DEX/PVA/plastificantes são suportes eficientes para imobilização de lipases com aplicações na síntese de ésteres de aroma, e em condições suaves de reação.

Palavras chave: transesterificação; esterificação; lipase; imobilização.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As enzimas, em geral, são proteínas de alta massa molar produzidas nos organismos vivos, e são formadas por uma longa cadeia de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas. Parte deste grupo de proteínas funciona como catalisadores em reações bioquímicas.

A maioria destas reações ocorreria muito lentamente se não fossem catalisadas por enzimas. Ao contrário dos catalisadores não protéicos (H^+ , OH^- , íons metálicos), cada enzima catalisa um pequeno número de reações, freqüentemente apenas uma. As enzimas, portanto são catalisadores com alta especificidade de reação. Essencialmente, todas as reações bioquímicas são catalisadas por estes biocatalisadores.

As enzimas são muito aplicadas na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas, sendo que estes biocatalisadores são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente em um dos isômeros de uma mistura racêmica.

Outra grande aplicação das enzimas é sua utilização na obtenção de ésteres de aromas, derivados ácidos carboxílicos com cadeias carbônicas médias ou curtas. Estes compostos são importantes em vários produtos nas indústrias de alimentos e de cosméticos. Os ésteres são produzidos por reações químicas ou extraídos de fontes naturais. A obtenção de ésteres através de reações químicas catalisadas principalmente por lipases tem recebido muita atenção para a utilização em alimentos e cosméticos. O desenvolvimento de um bom procedimento para melhorar o rendimento em conversão de ésteres, com catálise enzimática são atraentes para os fabricantes e consumidores.

A partir destas considerações, neste trabalho, propõe-se utilizar lipases de diversas procedências imobilizadas, ou não, em blendas poliméricas formadas por dextrana/ poli (álcoolvinílico) (DEX/PVA) como catalisadores em reações de esterificação e transesterificação, visando a obtenção de alcenoatos de benzila. Todas as reações serão realizadas em meio orgânico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos, em geral, de natureza protéica formados por uma longa cadeia de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas. São encontradas na natureza em todos os seres vivos.^{1,2} A seqüência exata de aminoácidos em uma proteína é denominada estrutura primária. A conformação tridimensional é chamada de estrutura secundária (**Figuras 1a e 1b**), e a disposição espacial da seqüência é denominada de estrutura terciária (**Figura 1c**).¹

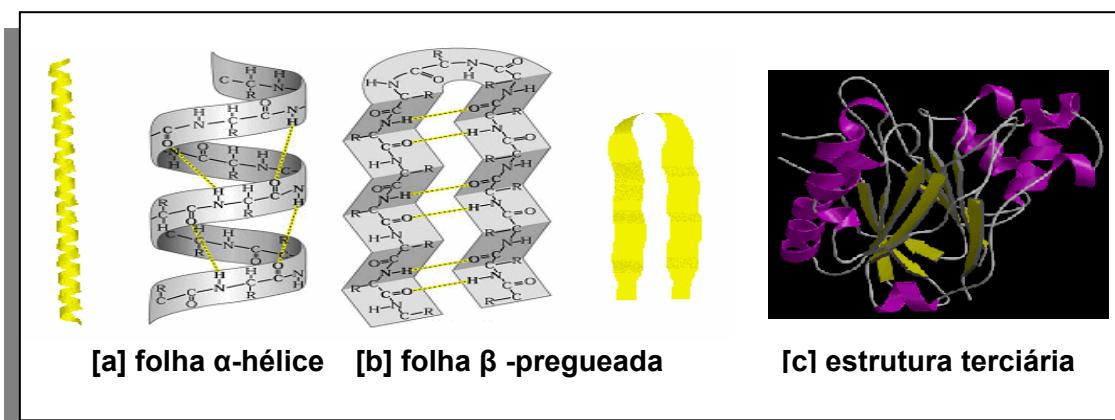


Figura 1. Representações gráficas da estrutura tridimensional de uma enzima.

As enzimas contêm um sítio ativo, o qual constitui somente uma pequena porção de seu volume total e que está usualmente próximo ou na superfície, estando assim acessível às moléculas de substratos. O sítio ativo contém aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional complementar ao substrato.³

As enzimas possuem atividade catalítica, diferente de outras proteínas. Com a sua presença e sem serem consumidas, elas aumentam a velocidade dos processos químicos, que de outra forma ocorreriam muito lentamente ou não totalmente. As enzimas são muito específicas pela conformação e composição química do sítio ativo, isto é, cada enzima poderá hidrolisar ou sintetizar um composto em particular.^{1,4,5}

2.2. Classificação das enzimas

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) divide as enzimas em seis grupos, e cada uma dessas dividem-se em sub-grupos de acordo com o tipo de reação catalisada (**Tabela 1**).^{1,4}

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS DE ACORDO COM A UIBBM.⁶

| Número | Classe | Tipo de reação catalisada | Subclasse |
|--------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1 | oxirredutases | Transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio | Hidrogenases, oxidases, peroxidases |
| 2 | transferases | Reações de transferência de grupos | Transaldolases, transcetolases |
| 3 | hidrolases | Reações de hidrólises | Esterases, lipases , peptidases, fosfatases |
| 4 | liases | Reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos | Descarboxilases, fosfatases |
| 5 | isomerases | Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros | Racemases, epimerases, oxiredutases, mutase |
| 6 | ligases | Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato | Sintetases |

Estes catalisadores são altamente eficientes, aumentando a velocidade das reações na ordem de 10^6 a 10^{14} vezes mais rápidas que as mesmas não catalisadas. A função de um catalisador é diminuir a energia de ativação (E_a) entre os reagentes e produtos. Esta habilidade ocorre devido à capacidade de aproximar os substratos em uma orientação tal que favorece a formação do complexo enzima-substrato (ES), para posteriormente formar os produtos (**Figura 2**).^{4,5,6}

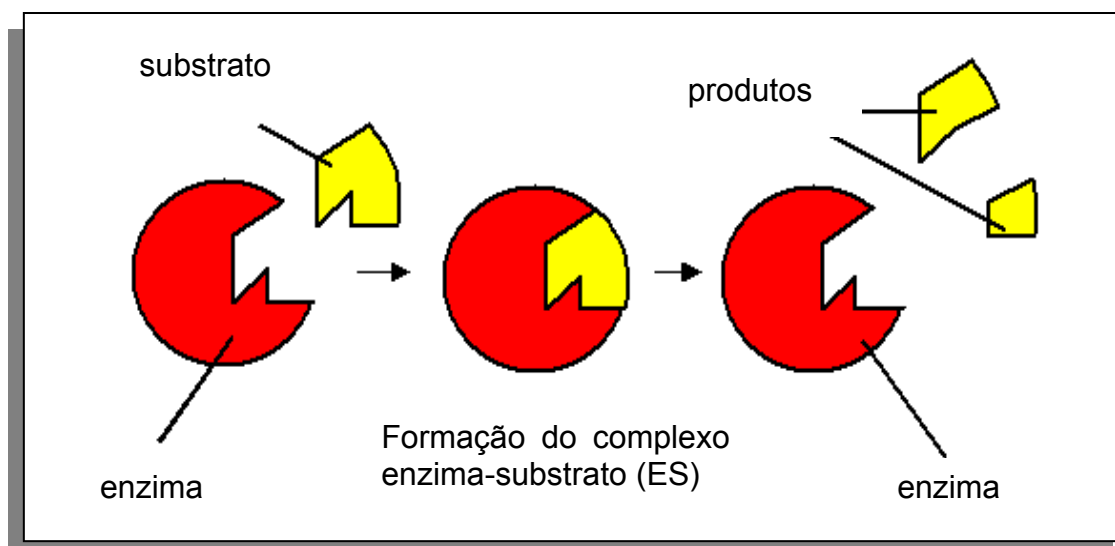


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.⁶

A formação do complexo enzima-substrato (ES) depende das chances de ocorrerem choques eficazes entre o sítio ativo e o substrato.^{5,6}

As enzimas hidrolíticas (proteases, celulases, amilases e lipases) são as mais usadas na química orgânica. Entre as várias razões que as tornam uma opção particularmente atrativa, pode-se citar a alta estabilidade e atividade com relação a vários substratos, são de baixo custo, atuam em condições suaves de sínteses e, em geral, não necessitam de co-fatores.^{4,7,8}

2.3. Lipases

As lipases são enzimas que catalisam as reações de hidrólises e estão presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos, bactérias. Estas enzimas são normalmente extracelulares, o que favorece sua extração, isolamento e purificação.^{4,7,8}

As lipases têm sido bastante utilizadas em várias áreas de biotecnologia, na indústria de alimentos como desenvolvimento de aromas e manutenção de queijo, de detergentes, na hidrólise de óleos e gorduras, na síntese de biosurfactantes, biodiesel, na produção de bebidas alcoólicas destiladas, e para tratamento de resíduos oleosos oriundos da indústria de couro e de papel.^{9,10} Na **Figura 3**, pode-se observar a representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antartica* (CAL-B)

com a ampliação do sítio ativo formado pela cadeia lateral da histidina, serina e aspartato.¹¹

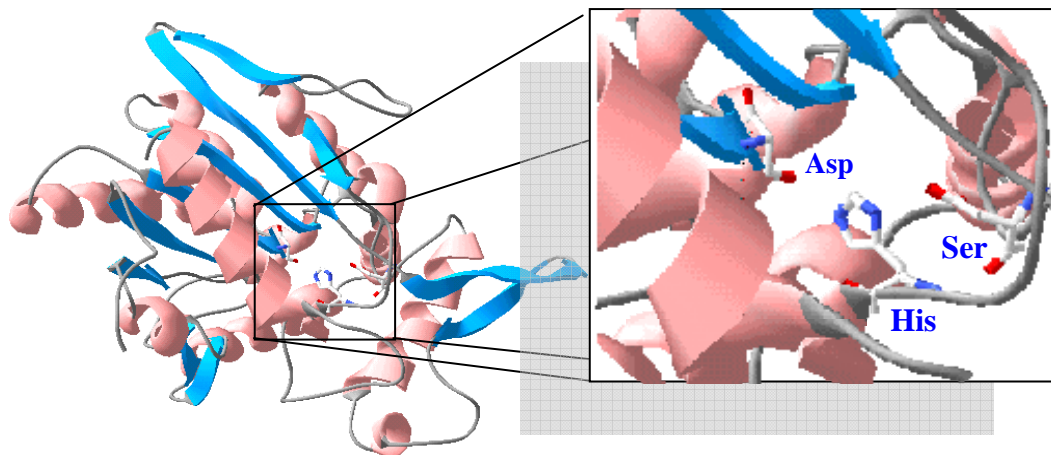


Figura 3. Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica* obtida por Raios-X¹¹

Todos os membros da família de estrutura α - β -hidrolases possuem um mecanismo comum de hidrólise de ésteres, que consiste em cinco etapas: ligação ao substrato éster (1); formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica com o oxiânion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio (2); hidrólise e saída da porção alcoólica (3), estabilização do segundo intermediário (4) e regeneração do sítio ativo e formação do produto (5) e (6). Estas etapas estão demonstradas na **Figura 4**.

Nas indústrias de alimentos e cosméticos as lipases são bastante usadas para a obtenção de ésteres de aromas. O desenvolvimento de pesquisas na área de esterificação enzimática tem sido crescente nas duas últimas décadas.^{2,12} Normalmente os ésteres de aromas são de cadeia curta tais como o acetato de *iso*-amila (banana), acetato de benzila (pêssego), antranilato de metila (uva), acetato de *n*-octila (laranja), butanoato de etila (abacaxi), acetato de *iso*-pentenila (suco de frutas), entre outros.¹³

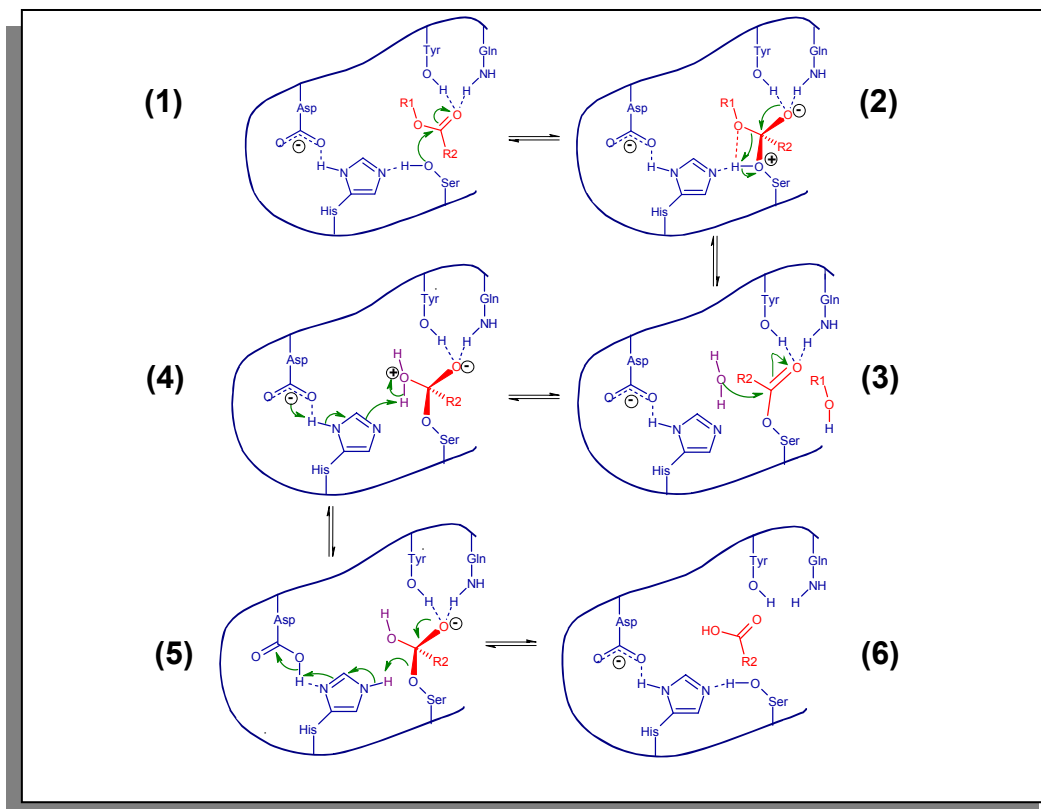


Figura 4. Mecanismo proposto para a hidrólise enzimática de um éster.

Habitualmente estes compostos são produzidos por síntese química ou extraídos de fontes naturais. Contudo, com o aumento da demanda natural as sínteses destes ésteres por reações químicas catalisadas com lipase tem também recebido muita atenção para a produção destes produtos.¹⁴

Nos últimos anos, foram publicados muitos artigos, relatando a produção, isolamento e modificação de hidrolases, em particular, lipases e esterases. Chang e col.¹⁴ utilizaram a lipase *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM-77) na obtenção do laurato de *n*-hexila (9) à partir do *n*-hexanol (8) e ácido láurico (7) em sistema livre de solvente. **Figura 5**

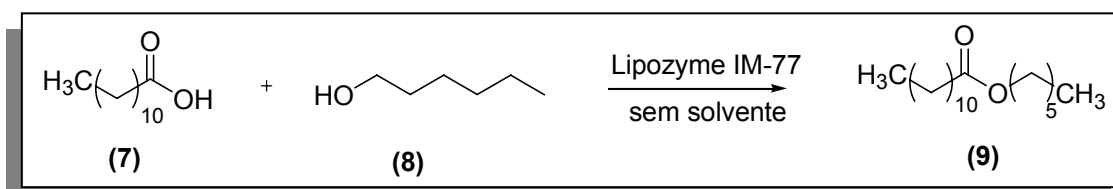


Figura 5. Preparação enzimática do laurato de *n*-hexila catalisada pela lipase Lipozyme IM-77.

Foram avaliados alguns parâmetros tais como a influência da temperatura, massa do biocatalisador, tempo e pH. Foi observado que as condições ótimas obtidas nesta reação de esterificação foi de 40 min, 58,2 °C, 25,4 mg de lipase e pH 5,9, obtendo-se conversões em laurato de *n*-hexila de 69,7%.¹⁴

Para aplicações específicas de lipases em sínteses e biotransformações, as vezes, é necessário que o biocatalisador esteja imobilizado. A imobilização pode melhorar a estabilidade, atividade e reutilização dos biocatalisadores.¹⁵

2.4. Imobilização de enzimas

Muitas enzimas são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar àquela encontrada na solução aquosa. Porém, estes catalisadores estão sujeitos à inativação em meio orgânico, quando não imobilizados, por fatores químicos, físicos ou biológicos. Visando protegê-los das interações com o solvente, técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas.^{4,15,16} O desenvolvimento destas técnicas tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, aumentar a estabilidade em solventes orgânicos e facilitar a separação dos produtos.^{15,16} O principal interesse em imobilizar o biocatalisador é manter a atividade e estabilidade da mesma maneira que na sua forma livre. Com a imobilização, espera-se que não ocorram modificações estruturais bem como de seu sítio ativo.^{10,15,16}

A escolha da matriz é muito importante para uma boa atuação do sistema com a enzima imobilizada. As características desejáveis para uma bom suporte são, área superficial grande, boa permeabilidade, características hidrofílicas, estabilidade química, mecânica e térmica, alta rigidez, forma e tamanhos adequados, resistência ao ataque de microorganismos e capacidade de reutilização.¹⁵ Diferentes métodos tem sido usado na imobilização de enzimas e estão divididos em três categorias, ligação em suporte: adsorção física, ligação iônica, ligação covalente, método de confinamento; em fibras, cápsulas e em gel como mostra a **(Figura 6)**.

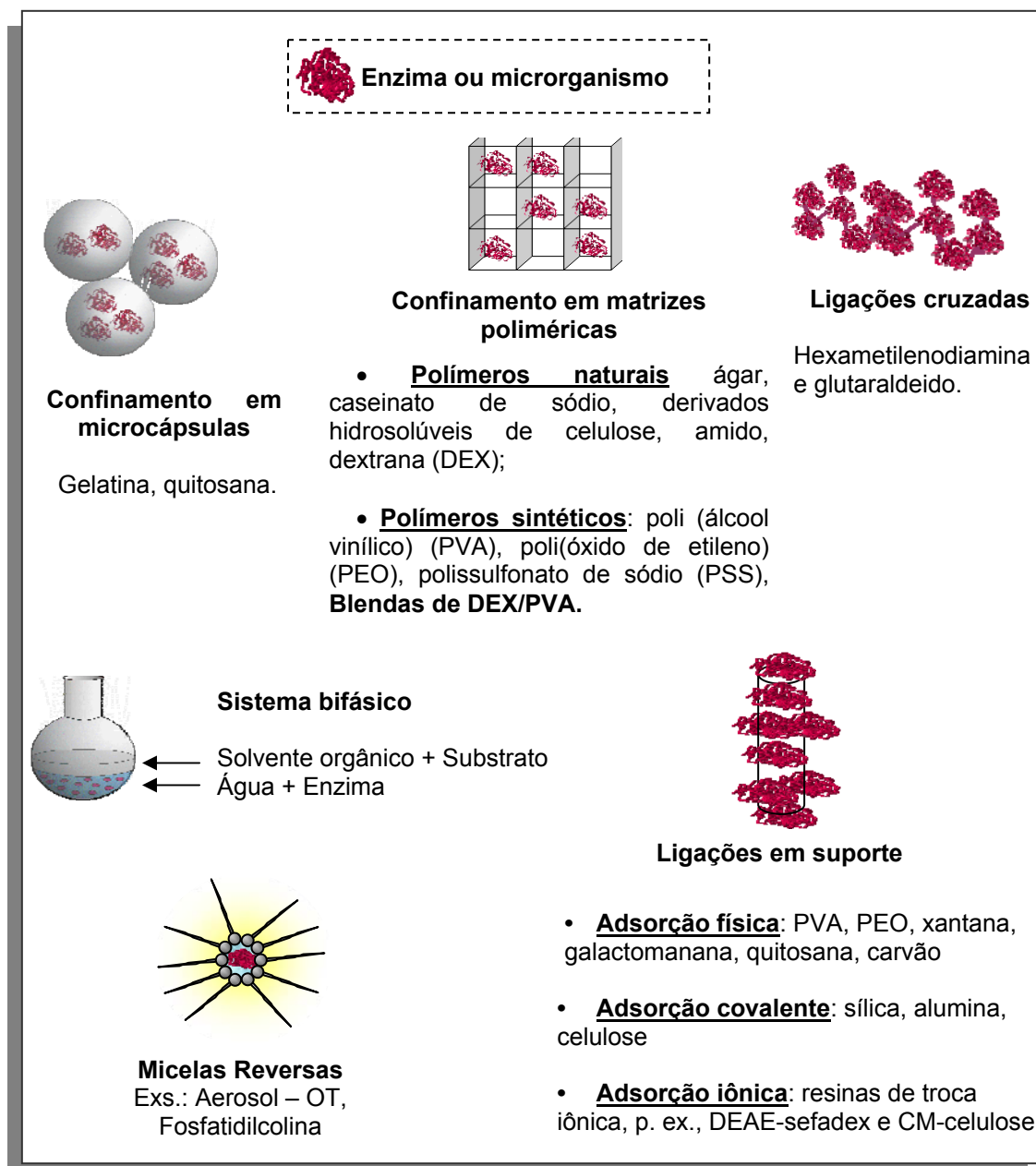


Figura 6. Principais métodos de imobilização de enzimas. (adaptado da ref.4).

O procedimento de adsorção de uma proteína em suportes sólidos é simples, e é um dos métodos mais utilizados. A imobilização por confinamento em matrizes sólidas é uma outra alternativa bastante usada. Um dos polímeros que vem sendo utilizados é a DEX e o PVA.

Wang e *col.*¹⁷ Imobilizaram a lipase de *Cândida rugosa* (LCR) em membranas formadas pela mistura de PVA (álcool polivinílico) e PTFE (politetraflúoretileno). Esse método de imobilização demonstrou ser bastante eficiente, pois, o PTFE atua como uma interface hidrofóbica na imobilização da

lipase para a manutenção de sua atividade. O uso de PVA nesta mistura evitou que a lipase se dissolvesse na água causando dessorção do biocatalisador do suporte. A **Figura 7**, mostra de forma detalhada o processo de imobilização. A eficiência do suporte foi medida através de análises de dessorção do biocatalisador e da atividade enzimática pela hidrólise de óleo de oliva.¹⁷

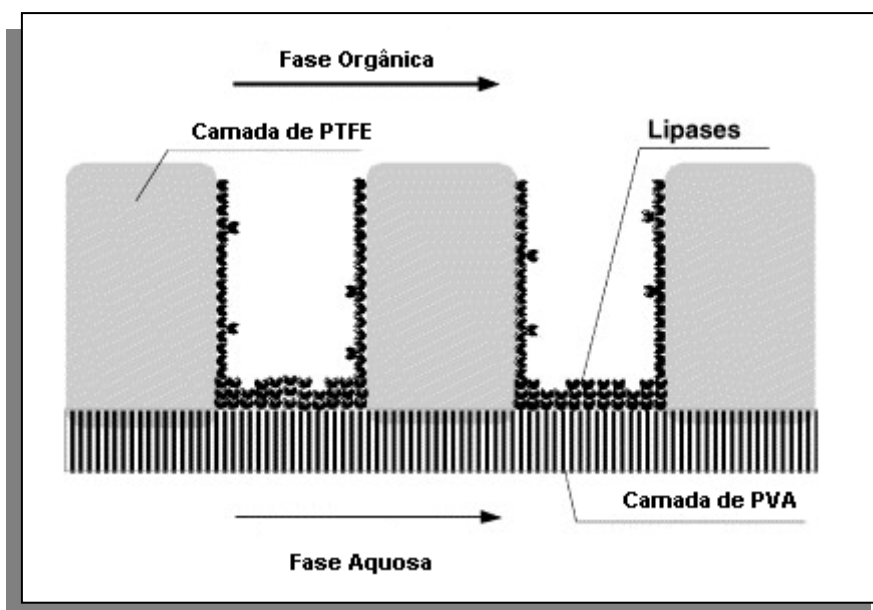


Figura 7. Representação esquemática para a imobilização de LCR em misturas de polímeros PVA/PTFE.

Outro método bastante particular de imobilização, é o sistema bifásico formado por água/solvente orgânico. Neste, a água é o suporte para as enzimas e o solvente orgânico é o suporte para o substrato. Fehér e col.¹⁸ prepararam em grande escala e em reator termostatzado, via enzimática, o acetato de *iso*-amila em sistema bifásico tolueno/liquido iônico (hexafluorofosfato de 1-butil-metilimidazolio). Os resultados mostraram que o éster pode ser obtido em grande escala com conversões de 99% de produto. Além disso, o reator pode ser reutilizado por até 10 vezes sem perda de rendimento em produto.

2.5. Dextranas

As dextranas constituem um grupo de polissacarídios estruturalmente relacionados entre si, de origem bacteriana, geralmente de alta massa molar, variando de 40 a 50 milhões podendo chegar até 100 milhões. São produzidas por algumas espécies de *Leuconostoc* principalmente *Leuconostoc mesenteroide*, quando a sacarose estiver no meio de crescimento destas bactéria.¹⁹

A dextrana é formada por unidades de D-glicose ligadas nas posições α -1 \rightarrow 6 com resíduos de cadeias ligadas na posição α -1 \rightarrow 3, e diferem quanto ao número de ramificações em 1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4, e na massa molar. São polissacarídeos neutros e quimicamente inertes, e, portanto, compatíveis com a maioria das substâncias existentes em alimentos.¹⁹ **(Figura 8)**

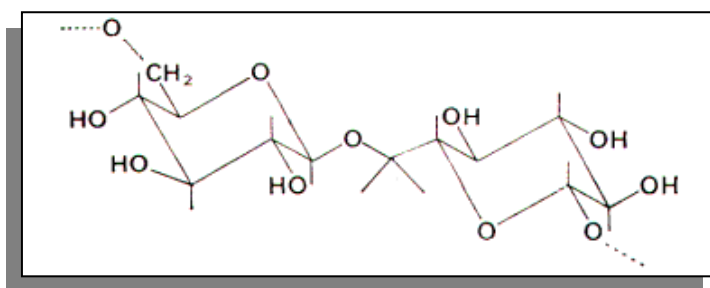


Figura 8. Estrutura monomérica da dextrana.¹⁹

Este polissacarídeo, tem sido muito aplicado no campo biomédico e farmacêutico. Estudos recentes mostram que a dextrana pode ser usada como modificadores de viscosidade, suportes para a cromatografia e matrizes para imobilização de enzimas e de fármacos.²⁰

2.6. Poli (álcool vinílico)- PVA

O poli (álcool vinílico) (PVA) **Figura 9** é um polímero sintético produzido através da hidrólise do poli (acetato de vinila).²¹

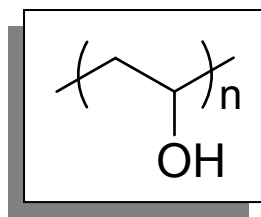


Figura 9. Estrutura monomérica do PVA.

Por suas propriedades, bastante distintas, e pelo seu baixo grau de toxicidade^{21,22}, o PVA vem sendo utilizado nas mais diversas áreas da ciência. Pode-se citar por exemplo, o trabalho de *Million e col²²*, onde estudaram a aplicação de PVA na área biomédica. Os resultados apontados por este grupo mostraram que o PVA pode ser aplicado como peça importante na formação de tecidos humanos sintéticos.

Outro trabalho que merece ter destaque, são os estudos realizados por Park e *col²³* onde utilizam blendas de PVA/ácido plurônico para o microencapsulamento de fármacos, visando a liberação controlada deste no organismo que for atuar. Neste trabalho foi usado o fármaco Venlafaxina, o qual é conhecido por suas propriedades anti-depressivas, **Figura 10**.

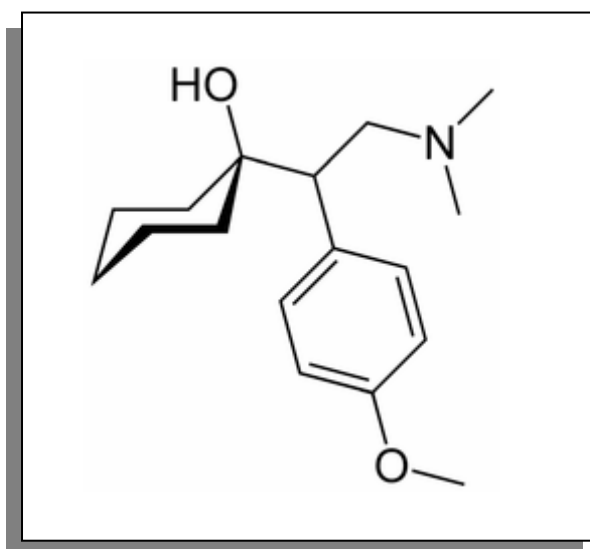


Figura 10. Estrutura da Venlafaxina

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Utilizar blendas poliméricas de dextrana (**DEX**) com poli(álcool vinílico) (**PVA**) como suportes para a imobilização de lipases, e utilizar estes sistemas (filmes) como catalisadores em reações de transesterificação ou esterificação em meio orgânico, para obtenção de alcenoatos de benzila.

3.2. Objetivos específicos

- Otimizar as condições experimentais para a preparação do filme de DEX /PVA.
- Avaliar a influência de plastificantes como o glicerol e/ou sorbitol na formação do filme de DEX/PVA.
- Determinar o teor de água no filme pelo método de titulação de Karl- Fischer.
- Avaliar a estabilidade do filme em função do solvente orgânico, e temperatura.
- Imobilizar as lipases de *Pseudomonas* sp; *Candida rugosa*; *Mucor javanicus*; *Rhizopus oryzae*; *Aspergillus niger*; *Pseudomonas*-sp (IM) no filme de DEX/PVA com os plastificantes.
- Avaliar o efeito da variação da massa de lipase imobilizada em filme de DEX/PVA em reações de transesterificação do acetato de vinila com álcool benzílico.
- Preparar ésteres de aroma alquílicos derivados do álcool benzílico e diferentes ácidos carboxílicos com lípases imobilizadas.
- Avaliar a reutilização do suporte (lípase/ filme de DEX/PVA) após a armazenagem em solvente orgânico na reação de transesterificação do acetato de vinila com álcool benzílico.
- Avaliar a influência de diversos solventes orgânicos na reação de transesterificação do acetato de vinila com álcool benzílico.
- Caracterizar e quantificar a conversão dos ésteres por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN – ^1H), e cromatografia de camada delgada.
- Comparar os resultados obtidos com outros reportados na literatura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

4.1. Reagentes, solventes e enzimas.

Os reagentes, que foram utilizados neste trabalho são:

- Dextrana; *Leuconostoc* (SIGMA massa molar: 10 000- 200 000 Daltons);
- PVA (VETEC, 85.300 Daltons).
- Ácidos: ácido láurico (VETEC); palmítico (VETEC); esteárico (VETEC); cinâmico (Menck); hexanóico (Aldrich); butirico (VETEC); caprílico (VETEC).
- Acetato de vinila, 98% (Fluka);
- Álcool: álcool benzílico, 99,8% (BAKERANALYZED);
- Enzimas: lipase AY de *Candida rugosa* - (Amano, 30.000 u/g); lipase M de *Mucor javanicus*-(Amano, 10.000 u/g); lipase PS de *Pseudomonas* sp-(Amano, 30.000 u/g); lipase F-AP15 de *Rhizopus oryzae*-(Amano 150.000 u/g); lipase A de *Aspergillus niger*- (Amano, 120,000 u/g) e lipase LPS-IM de *Pseudomonas*-sp (Amano, 500 u/g imobilizada em terra diatomácea)
- Sorbitol, 99,0% (VETEC);
- Glicerol, 99,5% (VETEC);
- Solventes: hexano (F.MAIA), heptano (VETEC), diclorometano (Nuclear), tolueno (F.MAIA), acetonitrila (VETEC) e éter etílico (Dinâmica);
- Clorofórmio deuterado (CDCl₃) (Aldrich);
- Sílica gel DGF Riedel-deHaën máx. 400 mesh.

4.2. Equipamentos

Os equipamentos que foram utilizados neste trabalho são:

- Espectrômetro de RMN¹H (VARIAN AC 400F, 400MHZ);
- Espectrofotômetro de infravermelho (FTIR da PERKIN ELMER 16C);
- Titulador 633 Automático Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau;
- Agitador com banho termostatizado tipo – Dubnoff Marconi HW 2000;
- Agitador com banho termostatizado Technal TE-0532;
- Agitadores magnéticos;
- Chapas de aquecimentos

4.3. Preparação das blendas de DEX/PVA com e sem enzima

Para a preparação do filme de DEX/PVA, foram solubilizadas em um béquer de 50mL, 0,0-0,6g de DEX e 0,0-0,7g de PVA em 20mL de água destilada com 0,1-0,2g de glicerol ou sorbitol, sob agitação constante por 1h. A adição do plastificante é necessária para evitar o caráter quebradiço do filme e para que estes sejam estáveis e maleáveis, conforme descrito por Mendieta-Taboada e col.²⁴ Após testes iniciais para a definição das condições que formam o filme mais estável, a composição usada nos estudos de imobilização foi 0,2g de DEX, 0,8g de PVA e 0,2g de sorbitol ou glicerol. A seguir, foram adicionadas 25-100mg de lipases de diferentes procedências a esta solução e o sistema foi novamente deixado sobre agitação constante por um período de 30 minutos, ou até completa homogeneização. A solução resultante foi depositada em uma placa de polietileno ou Petri e aquecida em um banho de areia à ~30° C para evaporação da água. Os filmes com as enzimas imobilizadas foram então cortadas em pequenas secções e transferidas para um erlenmeyer de 250 mL, para serem usadas nas reações biocatalisadas. (Figura 11).

Foram também preparados filmes de DEX/PVA com glicerol ou sorbitol na ausência de lipases. Estas foram usadas em estudos estabilidade em diversos solventes orgânicos.

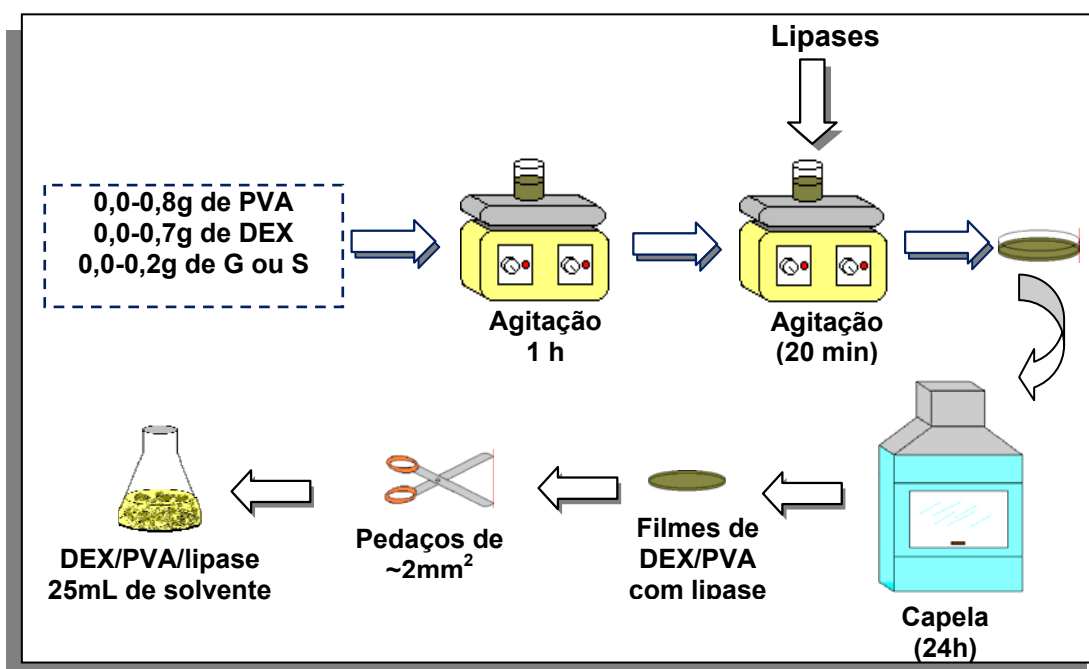


Figura 11. Preparação do filme de DEX/PVA e imobilização das lipases.

4.4. Preparação do meio reacional para as reações de transesterificação e esterificação

Para as reações de transesterificação adicionou-se em um erlenmeyer de 250 mL, hexano (25 mL), álcool benzílico (5 mmol, 0,5 mL), acetato de vinila (5 mmol, 0,5 mL), e a lipase de *Pseudomonas* sp. imobilizada em blenda de DEX/PVA. A mistura reacional foi deixada em banho termostatzado com agitação orbital da Technal TE-0532 em temperatura de 35 °C por um período de até 72 horas, ou até que a reação se complete. **Figura 12.**



Figura 12. Agitador com banho termostatzado da Technal TE-0532.

As reações foram monitoradas periodicamente por cromatografia de camada delgada (ccd) usando como eluente hexano:acetato de etila 8:2 . O valor encontrado para o R_f do acetato de benzila foi de 0,83. Outras lipases, como *Candida rugosa*- AY; *Mucor javanicus*- M; *Pseudomonas* sp- LPS; *Rhizopus oryzae*- F-AP15; *Aspergillus niger*- A *Pseudomonas*-sp- IM (imobilizada em terra diatomácea) foram também imobilizadas em blendas de DEX/PVA e posteriormente utilizadas nas reações de transesterificação entre o acetato de vinila e o álcool benzílico, por 72 h a 35 °C.

Para as reações de esterificação adicionou-se em um erlenmeyer de 250 mL, hexano (25 mL), álcool benzílico (5 mmol, 0,5 mL) e diferentes doadores acilas tais como os ácidos butírico (5 mmol, 0,45 mL), hexanóico (5 mmol, 0,62 mL) e caprílico (5 mmol, 0,8 mL) e a lipase *Pseudomonas* sp. (LPS) imobilizada em blenda de DEX/PVA. A mistura reacional foi deixada durante 72 h em banho termostatzado da Technal TE-0532, a 35°C.

Após o término das reações, a mistura reacional foi transferida para um balão de fundo redondo e a blenda/plastificante/lipases foi lavada com solvente orgânico por diversas vezes para assegurar que todos reagentes e o produto fossem retirados do filme (acompanhando por ccd). A seguir, o solvente foi evaporado do balão no rota-evaporador, obtendo-se o éster desejado. **(Figura 13).**

Após evaporação do solvente, o produto foi quantificado por análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-RMN¹H, por comparação da área dos hidrogênios metilênicos do álcool em 4,54 ppm com os do éster em 5,03 ppm. **(Figura 14).**

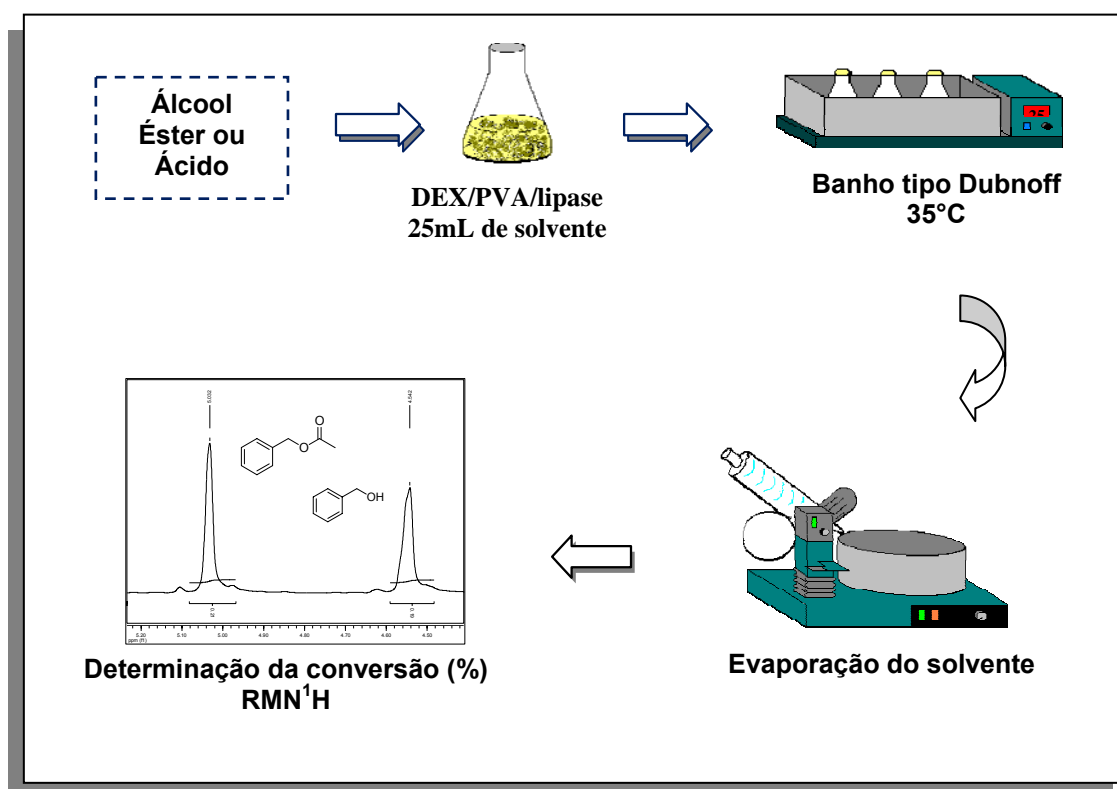


Figura 13. Preparação do meio reacional e análise do produto.

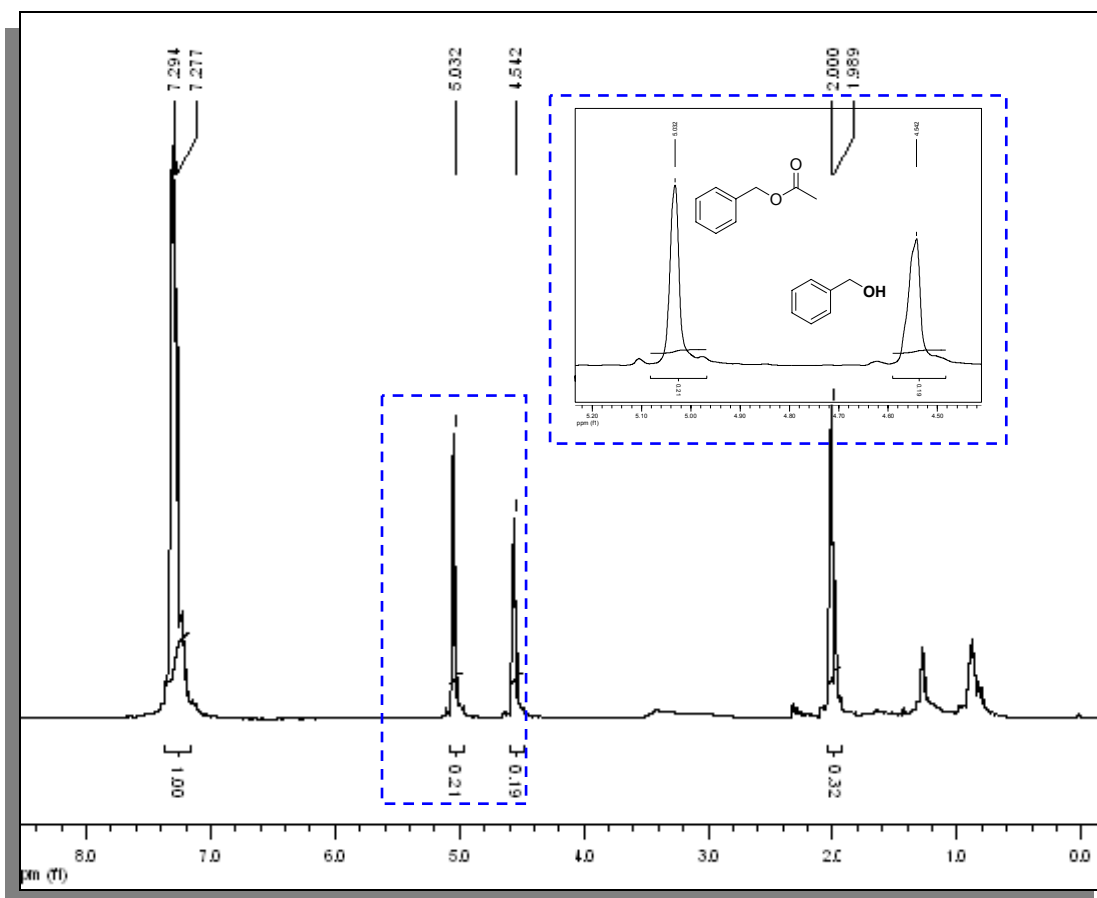


Figura 14. Espectro de RMN¹H de uma alíquota da reação de esterificação do acetato de vinila com o álcool benzílico, conversão 53%. [DEX/PVA/S, LPS 50mg, *n*-hexano, 35°C, 72h (400MHZ, CDCl₃)]

Na análise de ccd foi utilizado *n*-hexano:acetato de etila (8:2) como eluente. Para a alíquota de reação citada anteriormente, foram observadas duas manchas, com R_{fs} de 0,83 e 0,53; correspondendo ao acetato de benzila e ao álcool benzílico, respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram inicialmente preparadas blendas de DEX/PVA. Determinou-se a melhor composição em função da composição dos polímeros e plastificante, e a seguir a estabilidade das mesmas em diversos solventes orgânicos. Foi também avaliado o teor de água nos suportes. A seguir, lipases de diferentes procedências foram imobilizadas, e utilizadas como biocatalisadores nas reações de transesterificação e esterificação com o álcool benzílico com diversos agentes acilantes. Os produtos foram analisados por técnicas espectroscópicas de IV e RMN-¹H.

5.1. Preparação e Caracterização dos suportes

5.1.1. Preparação do filme de DEX/PVA

Para obtenção da melhor composição na formação do filme de DEX/PVA, foram realizados diferentes testes variando-se a massa de DEX e PVA na ausência de plastificante. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 2**.

Tabela 2. Influência da massa de dextrana e PVA na formação do filme.^a

| Entradas | Dextrana (g) | PVA (g) | Aspecto do filme |
|----------|--------------|---------|-------------------------|
| 1 | 0,6 | 0,1 | Fino, quebradiço |
| 2 | 0,4 | 0,3 | Consistente, quebradiço |
| 3 | 0,2 | 0,5 | Consistente, quebradiço |
| 4 | 0,0 | 0,7 | Fino, quebradiço |
| 5 | 0,7 | 0,0 | Fino, quebradiço |

^aV= 20mL de água

A partir dos resultados da **Tabela 2**, pode-se observar que os filmes de DEX/PVA ou com os polímeros puros, apresentaram-se quebradiços e muito

finos, com todas as composições utilizadas. Portanto, estes não são adequados para serem utilizados como suportes para as lipases.

Na tentativa de aumentar a maleabilidade do filme, foram adicionados a solução dos polímeros glicerol (G) ou sorbitol (S) em quantidades variáveis, como plastificantes. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Influência da massa de dextrana, PVA e plastificantes na formação do filme.^a

| Entradas | Dextrana (g) | PVA (g) | Glicerol (g) | Sorbitol (g) | Aspecto do filme |
|----------|-----------------|------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
| 1 | 0,0 | 0,7 | 0,1 | | Maleável, não consistente |
| 2 | 0,1 | 0,6 | 0,1 | | Maleável, não consistente |
| 3 | 0,2 | 0,8 | 0,2 | | Maleável, consistente |
| 4 | 0,2 | 0,5 | 0,1 | | Não maleável, grudento |
| 5 | 0,4 | 0,3 | 0,1 | | Não maleável, grudento |
| 6 | 0,6 | 0,1 | 0,2 | | Não maleável, quebradiço |
| 7 | 0,0 | 0,7 | | 0,1 | Maleável, não consistente |
| 8 | 0,1 | 0,6 | | 0,1 | Maleável, não consistente |
| 9 | 0,2 | 0,8 | | 0,2 | Maleável, consistente |
| 10 | 0,2 | 0,5 | | 0,1 | Não maleável, grudento |
| 11 | 0,6 | 0,2 | | 0,2 | Não maleável, quebradiço |

^av= 20mL de água.

Pelos resultados mostrados na **Tabela 3**, pode-se observar que quando foi adicionado o glicerol ou sorbitol junto ao PVA e sem a DEX, o filme formado era maleável e não consistente (Entradas 1 e 7). Assim, foi aumentando a massa de DEX e diminuindo a de PVA, na presença de glicerol ou sorbitol. Os filmes formados continuaram com aspecto maleável, porém não consistentes (Entradas 2 e 8).

Aumentando a massa de DEX e diminuindo a de PVA, os resultados obtidos ainda foram insatisfatórios, pois o filme formado era grudento e não maleável (Entradas 4,5 e 11). Com um aumento na massa do plastificante e variando a massa de DEX e PVA, o resultado foi satisfatório sendo que obteve-

se um filme consistente e maleável com 0,2g de DEX, 0,8g de PVA e 0,2g de sorbitol ou glicerol (Entradas 3 e 9).

A partir destes estudos, a composição do filme de DEX/PVA a ser utilizada para a imobilização das lipases foi de 0,2g de DEX, 0,8g de PVA e 0,2g de sorbitol ou glicerol solubilizados em 20mL de água.

Este estudo mostrou que a adição do plastificante é importante para a formação de um filme homogêneo e maleável.

Sebrão e *col.*¹⁵ utilizaram lipases de *Pseudomonas sp* (LPS) e de *Rhizopus oryzae* (LRO) imobilizadas em matrizes poliméricas como o caseinato de sódio com glicerol. O biocatalisador imobilizado foi usado na preparação de oleatos de *n*-pentila. Os resultados foram satisfatórios, sendo que a atividade catalítica do biocatalisador manteve-se por um período de estocagem de 46 dias. O biocatalisador imobilizado foi reutilizado por até 10 vezes sem diminuições consideráveis na conversão em éster (60%).

Mendieta e *col.*²⁴, estudaram a análise dinâmico-mecânica de aplicações em filmes comestíveis, e observaram que o uso de agentes plastificantes é necessário para evitar o caráter quebradiço deste material comestível.

5.1.2. Efeito do solvente orgânico no filme de DEX/PVA/plastificante

Os filmes de DEX/PVA/plastificantes sem as lipases foram submetidos a testes de estabilidade em diferentes solventes orgânicos com polaridades variadas. Os solventes utilizados foram o hexano (log P 3,50), heptano (log P 4,00), acetonitrila (log P -0,33), tolueno (log P 2,50), éter etílico (log P 0,83) e dicloro metano (log P 1,50)²⁵.

Os filmes foram armazenados em tubos de ensaio com 2mL dos solventes citados acima por 24h a temperatura ambiente. Após este tempo, todos os filmes de DEX/PVA/S ou DEX/PVA/G permaneceram estáveis, sem alterações macroscópicas. Assim, estes mostraram-se adequados para serem usados nos estudos posteriores das reações de transesterificação e esterificação.

5.1.3. Determinação do teor de água

Para a determinação do teor de água, foram preparados os filmes de DEX/PVA/plastificante segundo a composição descrita nas Entradas 3 e 9 da **Tabela 4**. Foram também preparados filmes contendo 50mg de LPS.

O teor de água nas blendas de DEX/PVA/plastificante foi determinado pelo método de titulação Karl-Fischer, que se baseia na determinação quantitativa da água em uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo²⁶ (**Figura 15**).



Figura 15. Titulador 633 Automático Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Determinação do teor de água nas blendas de DEX/PVA/plastificante

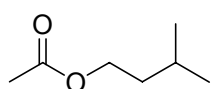
| Sistemas | Teor de água (%) |
|----------------------|------------------|
| DEX/PVA/Sorbitol | 11 |
| DEX/PVA/Glicerol | 13 |
| DEX/PVA/Sorbitol/LPS | 7 |
| DEX/PVA/Glicerol/LPS | 9 |

Os filmes, contendo ou não a LPS, apresentaram um teor de água de 7-13%. Esta informação é importante, pois já está documentado na literatura, que as enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água para manter sua conformação nativa e conseqüentemente sua atividade catalítica.⁹

A presença de água nas blendas é importante, pois ajuda a preservar a conformação nativa das lipases, mantendo assim a sua atividade catalítica após a imobilização nestes suportes.

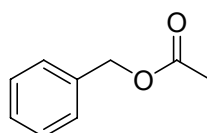
5.2 Preparação do acetato de benzila catalisada por lipases

Como já citado na seção 2.3, em geral, os ésteres de aromas são de cadeia curta tais como o acetato de *iso*-amila (banana) **(10)**, acetato de benzila (pêssego) **(11)**, acetato de *n*-octila (laranja) **(12)**, antranilato de metila (uva) **(13)**, butanoato de etila (abacaxi) **(14)** e acetato de *iso*-pentenila (suco de frutas) **(15)**, entre outros.¹³



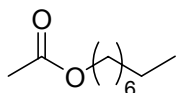
(10)

acetato de *iso*-amila



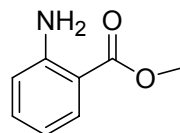
(11)

acetato de benzila



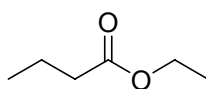
(12)

acetato de *n*-octila



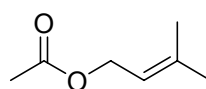
(13)

antranilato de metila



(14)

butanoato de etila



(15)

acetato de *iso*-pentenila

O acetato de benzila **(11)**, foi obtido através da reação de transesterificação do acetato de vinila com álcool benzílico **(16)**, via catálise enzimática, com diferentes lipases imobilizadas em filmes de DEX/PVA/S ou DEX/PVA/G. As reações foram realizadas com quantidades equimolares de substratos (5mmol) e 50mg de lipases a 35°C por 72h em *n*-hexano **(Figura 16)**.

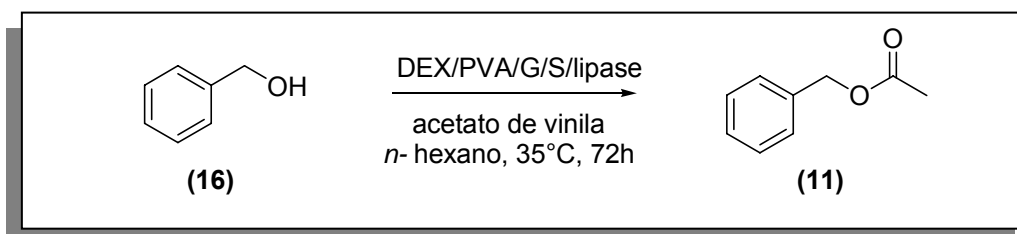


Figura 16. Preparação do acetato de benzila, *via* transesterificação.

A porcentagem de conversão ao acetato de benzila foi determinada através de análises dos espectros de RMN- ^1H . A conversão de éster foi obtida comparando as integrais dos sinais dos hidrogênios metilênicos do álcool benzílico e do éster em 4,69 e 5,13 ppm, respectivamente (Seção 3.4).

A **Figura 17**, mostra o espectro de RMN- ^1H do acetato de benzila, após purificação em cromatografia de coluna, ilustrada na **Figura 18**. Na análise de ccd, e utilizando como eluente *n*-hexano:acetato de etila (8:2), foi observado apenas uma mancha com R_f de 0,83 .

Em 5,13 ppm tem-se um singlete referente ao sinal dos hidrogênios metilênicos do éster ($-\text{CH}_2\text{O}-$), em 4,69 ppm tem-se um singlete referente ao sinal dos hidrogênios metilênicos do álcool benzílico. Em 2,09ppm, tem-se o singlete referente ao grupo $-\text{CH}_3$. Em 7,34 ppm é observado um singlete referente aos cinco hidrogênios do anel aromático. Mesmo após purificação, é observado em 4,69 ppm um singlete correspondente ao grupo metileno próximo ao grupo $-\text{OH}$ álcool benzílico, porém em baixa porcentagem (<5%). Os outros picos, provavelmente referem-se a presença do eluente (hexano:acetato de etila 8:2).



Figura 18. Cromatografia em coluna.

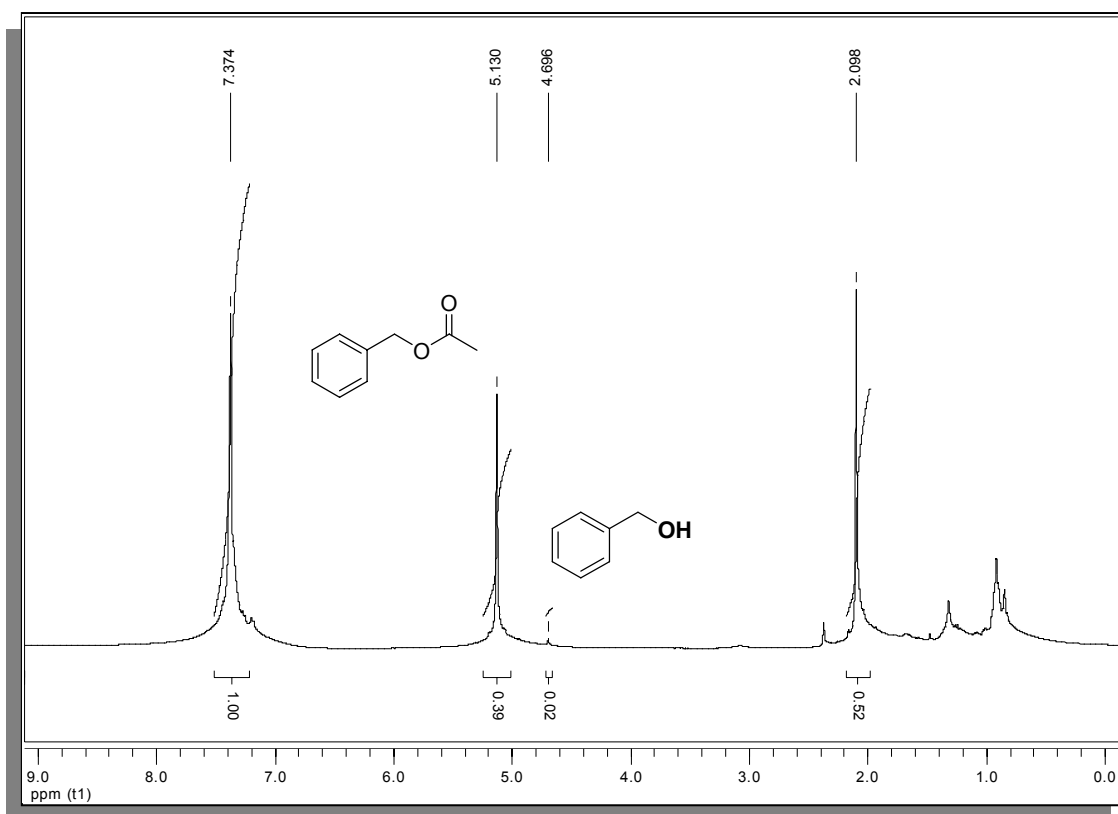


Figura 17. Espectro de RMN- ^1H do acetato de vinila, após purificação em cc. Conv. 95,1%. [DEX/PVA/ 50mg LPS, *n*- hexano, 35°C, 72h (400MHZ, CDCl_3)].

Outra técnica usada para comprovar a formação do acetato de benzila foi através de espectroscopia de infravermelho (IV). Pela análise do espectro de infravermelho observam-se bandas características do estiramento da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) do éster em 1738cm^{-1} , e em 1240cm^{-1} o estiramento da ligação ($\text{C}-\text{O}$) também do éster. As bandas em 2958cm^{-1} e 3032cm^{-1} são características do estiramento dos hidrogênios alifáticos, confirmando a formação do produto desejado. Também não foi observado a banda característica de estiramento da hidroxila ($-\text{OH}$), confirmando que o álcool benzílico não está presente ou está em pequenas quantidades (**Figura 19**).

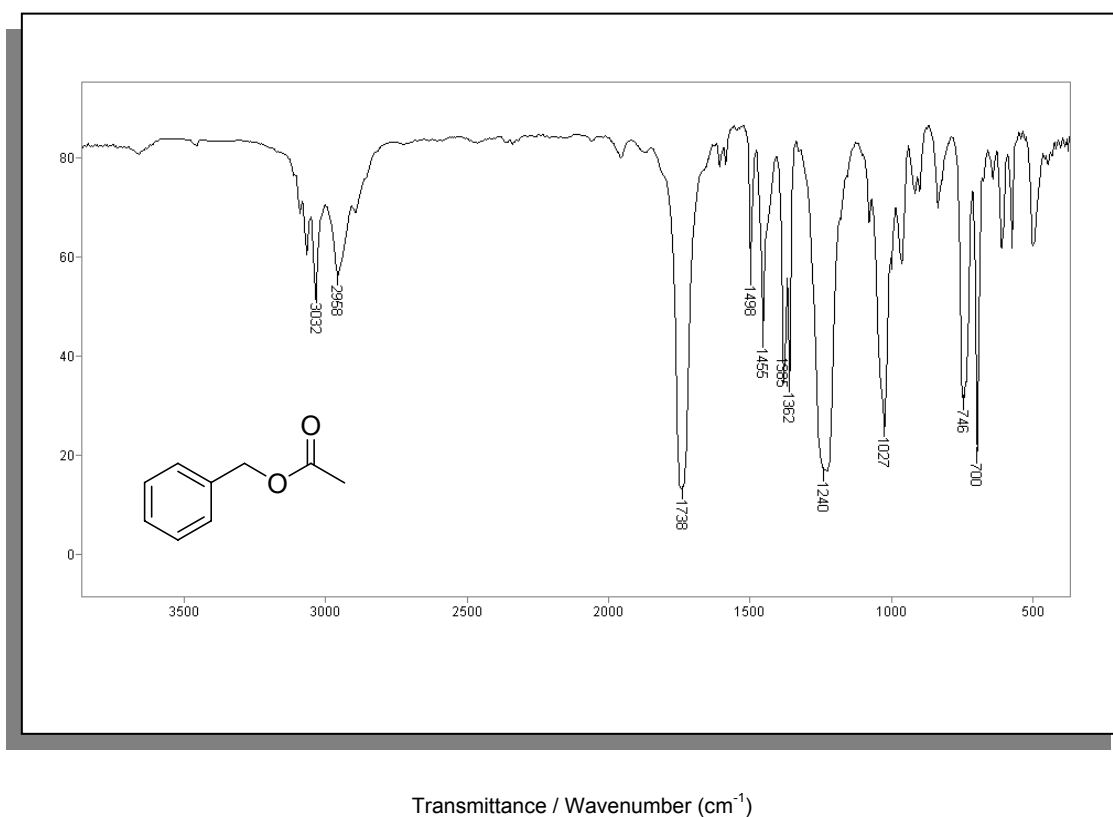


Figura 19. Espectro de IV do acetato de benzila purificado.(filme)

5.2.1. Influência da imobilização de diversas lipases em filmes de Dex/PVA/S e Dex/PVA/G.

Lipases de outras procedências foram imobilizadas em filmes de DEX/PVA/S e **Dex/PVA/G**, e a seguir utilizadas como catalisadores na reação de transesterificação do acetato de vinila com o álcool benzílico. Os resultados estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Conversão do acetato de benzila utilizando diferentes lipases imobilizadas^(a)

| Lipase | Atividade | DEX/PVA/S ^(b) (%) | DEX/PVA/G ^(b) (%) |
|--------|-------------|------------------------------|------------------------------|
| LPS | 30,000 u/g | 95 | 92 |
| LRO | 150,000 u/g | 53 | 23 |
| LAY | 30,000 u/g | 15 | 29 |
| LMJ | 10,000 u/g | 13 | 26 |
| LAN | 120,000 u/g | 20 | 59 |
| LPS-IM | 500 u/g | 92 | 90 |

(a) Massa da lipase (50mg), acetato de vinila (5mmol), álcool benzílico (5mmol), *n*-hexano, 35°C, 72h, (b) Determinado por RMN-¹H

A conversão em acetato de benzila foi dependente da fonte de lipase imobilizada variando-se entre 13-95% e do plastificante. As maiores conversões em acetato de benzila foram obtidas quando a LPS e a LPS-IM foram imobilizadas em filmes de DEX/PVA/S e DEX/PVA/G, sendo de 95, 92, 90% respectivamente.

Com a LPS-IM, que é uma lipase que já está imobilizada em terra diatomácea, o acetato de benzila foi obtido com conversão foi de 91%. Este é um bom resultado, mas tem-se como desvantagem a possível perda de massa de enzima em processos de reutilização. Portanto, foi feito uma dupla imobilização no filme de DEX/PVA/S ou DEX/PVA/G.

As conversões em acetato de benzila com as lipases LAY e LMJ foram menores, variando-se de 13-29%. Com as lipases LRO e LAN as conversões foram moderadas e variaram de 20-59%.

Estes resultados mostram que as conversões ao produto, não estão somente relacionadas com diferenças na atividade catalítica de cada enzima, mas também com o suporte utilizado ou seja, neste caso, com o plastificante.

É interessante observar que com a LPS e LAY imobilizadas em filmes de DEX/PVA/S e DEX/PVA/G, que possuem a mesma atividade, as conversões foram de 95 e 15%, e 92% e 29 %, respectivamente. Para tentar explicar este resultado, deve-se considerar a possível presença de outras enzimas e/ou proteínas no preparado enzimático comercial, a interação diferenciada dos substratos com o sítio ativo destas lipases e a interação de cada enzima com o

suporte^{4,27} Villeneuve, 2000²⁷ Segundo Pleiss e col.²⁸, o tamanho da cavidade do sitio ativo de cada lípase é diferenciado, o que pode resultar em interações e conversões diferente para cada uma delas.

5.2.2. Reutilização das blendas DEX/PVA/S e DEX/PVA/G

Após 30 dias de estocagem, a temperatura ambiente, foi feito a reutilização dos filmes com as mesmas lipases conforme descrito na seção 3.2. Os resultados obtidos ao utilizar os filmes de DEX/PVA/S/Lipases e DEX/PVA/G/Lipases, estão apresentados na **Figura 20 e 21**.

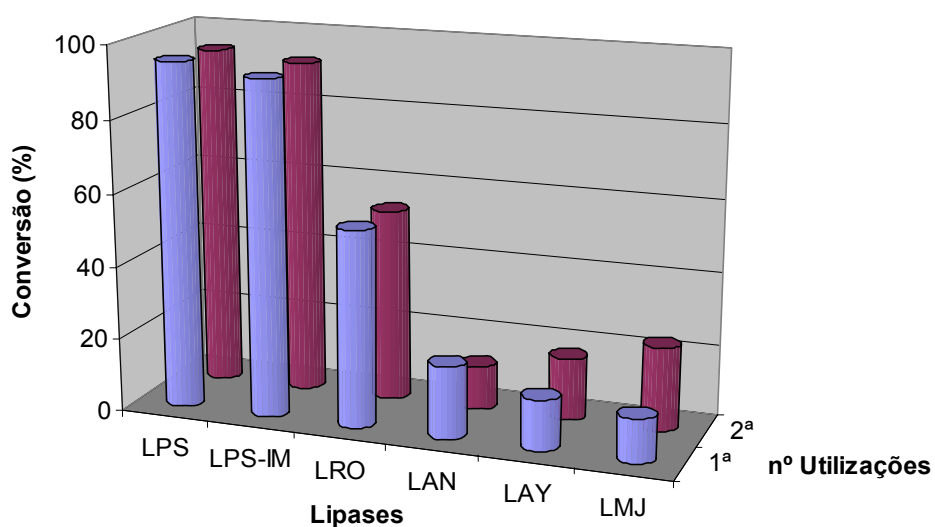


Figura 20. Conversão do acetato de benzila em função da reutilização dos filmes após 30 dias, utilizando como catalisador os sistemas DEX/PVA/S/Lipases, [*n*-hexano, 72h, 35°C, 50mg de lipases]

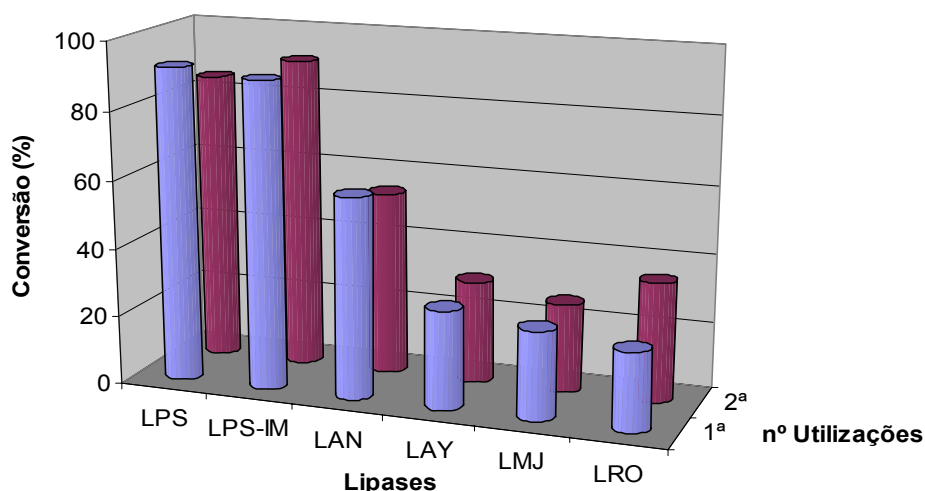


Figura 21. Conversão do acetato de benzila em função da reutilização dos filmes após 30 dias, utilizando como catalisador o sistema Dex/PVA/G/Lipases, [*n*-hexano, 72h, 35°C, 50mg de lipases]

Após a primeira utilização, pode-se observar que os resultados foram satisfatórios e similares aos da primeira reutilização formando os produtos com conversões de 12-94%,

Com a reutilização das lipases LRO, LAY, LMJ, observou-se um pequeno aumento em conversão do acetato de benzila. Pode-se explicar este resultado devido à presença de traços dos substratos oriundos da primeira utilização e que não foram totalmente removidos, mesmo após as sucessivas lavagem dos filmes.

Os resultados da reutilização demonstraram que a imobilização no suporte DEX/PVA/S ou G é vantajosa, devido à proteção dos biocatalisadores dos solventes orgânicos.

5.2.3. Efeito da massa de lipase

A seguir, foi realizado um estudo da influência da massa de LPS e LRO imobilizadas nos filmes de DEX/PVA/S na obtenção do **11**. As conversões em éster em função da massa de lipase bem como suas procedências, estão demonstradas na **Figura 22**.

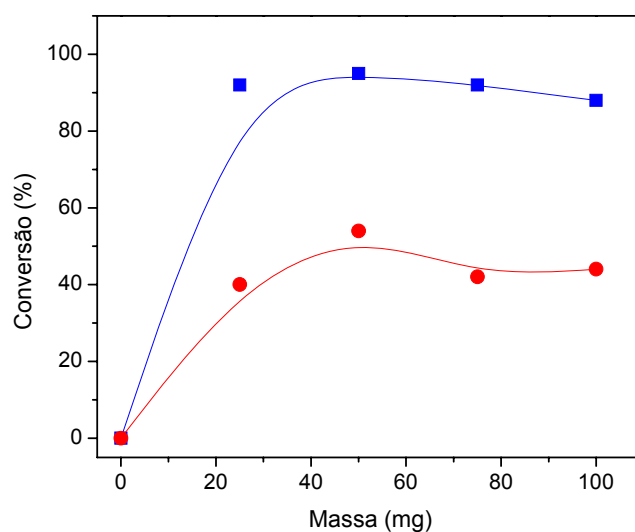


Figura 22. Conversão em acetato de benzila em função da massa de LPS (■) e LRO (●) imobilizadas em filmes de DEX/PVA/S, *n*-hexano, 35°C.

Analisando a Figura 18, pode-se observar que os maiores valores de conversão em **11**, foram obtidos com 50mg de ambas lipases sendo de 95% com a LPS e 54% com a LRO. Os resultados também demonstraram que neste caso, não há uma relação direta entre a conversão em **11** com o aumento da massa de lipase, em especial com a LRO, que formou o éster com conversões de 40-54%. Utilizando a LPS, as conversões foram de 88-95%, independente da massa do biocatalisador. A partir desses resultados, nos experimentos subsequentes, foi utilizado 50mg de lipase.

5.2.4. Efeito da influência do solvente

A polaridade dos solventes é avaliada pelo logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água ($\log P$)²⁵. Portanto, solventes de diferentes polaridades foram usados para avaliar a sua influência na obtenção do acetato de benzila, utilizando-se como catalisador o sistema DEX/PVA/S/LPS. Este foi selecionado por ter formado o éster em boas conversões, conforme citado anteriormente. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6- Efeito do solvente orgânico na conversão do acetato de benzila catalisada pelo sistema DEX/PVA/S/LPS.^a

| Entradas | Solvente | Log P ^b | Conversão ^c (%) |
|----------|---------------|--------------------|----------------------------|
| 1 | heptano | 4,0 | 91 |
| 2 | hexano | 3,5 | 95 |
| 3 | tolueno | 2,5 | 88 |
| 4 | diclorometano | 1,5 | 42 |
| 5 | éter etílico | 0,85 | 48 |
| 6 | acetonitrila | -0,33 | 75 |

(a) Solvente 25mL; 35°C; 72h; acetato de vinila (5mmol), álcool benzílico (5mmol), LPS (50mg); (b) Ref 23 ; (c) determinada por RMN-¹H.

Os resultados obtidos demonstram que os solventes menos polares log P > 2,5 (entradas 1,2 e 3) foram mais eficientes na obtenção do acetato de benzila obtendo-se maiores conversões, sendo de 88-95%. Utilizando-se solventes mais polares log P < 2,5 (entradas 4 e 5) o éster foi obtido com menores conversões sendo de 42-48%, sendo este um resultado esperado. Porém, ao utilizar o solvente acetonitrila (entrada 6) obteve-se uma boa conversão em éster sendo de 75%. Resultados similares foram obtidos por Moreira e *col.*²⁹ onde se obteve maiores conversões usando a acetonitrila como solvente na epoxidação quimio-enzimática do (+)-3-careno. Bitencourt e *col.*³⁰ também obtiveram máxima conversão em 2-etilhexilamina-3-feniloxaziridina a partir da N-benzilidene-2-etilhexilamina via quimioenzimática.

Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura. Segundo Laane *et al.*²⁵ os solventes que possuem log P < 2 são hidrofílicos, não são muito adequados para biocatálise alterando fortemente a interação água/biocatalisador tornando-se inativo ou ocasionando a desnaturação, os solventes com log P entre 2 e 4 são também hidrofílicos, mas atrapalham menos a interação água/biocatalisador. Os solventes com log P acima de 4 são hidrofóbicos, e não afetam esta interação deixando assim o biocatalisador no seu estado ativo.^{23,25}

5.2.5. Efeito do tamanho da cadeia alquílica para obtenção dos alcenoatos de benzila

Na reação de esterificação do álcool benzílico foram utilizados diferentes ácidos carboxílicos, variando-se o tamanho da cadeia alquílica. Foram utilizados os ácidos butírico (4C), hexanóico (6C), octanóico (8C), cinâmico (9C), láurico (12C), palmítico (16C), e esteárico (18C). As reações foram realizadas utilizando como catalisador a LPS *Pseudomonas*-sp (50mg) imobilizada em filmes de DEX/PVA/S em *n*-hexano. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Figura 23**.

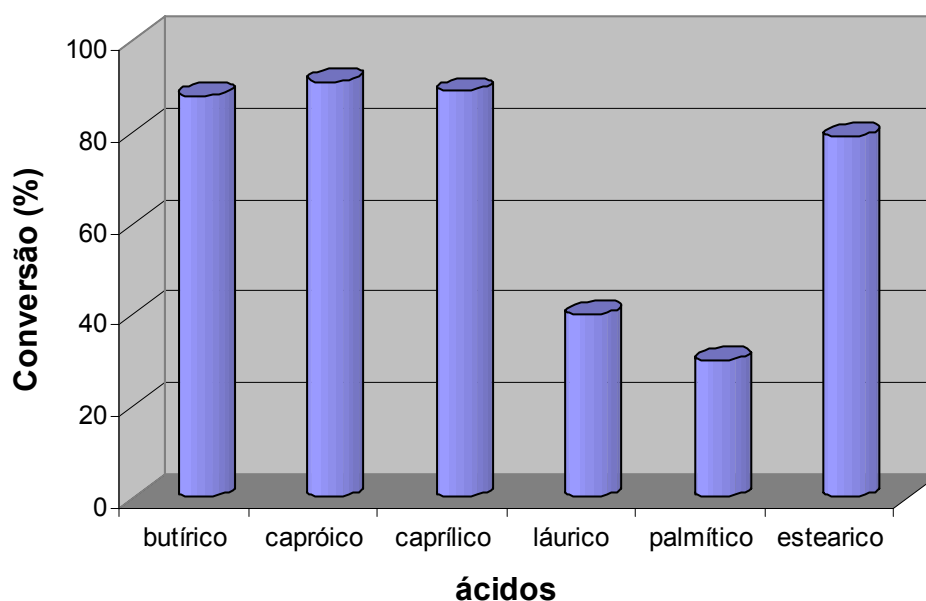
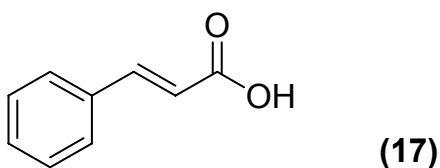


Figura 23. Conversão dos alcenoatos de benzila em função do tamanho da cadeia alquílica dos doadores acilas utilizando como catalisador LPS/DEX/PVA/S. [LPS 50mg, 35°C, 72h, *n*- hexano]

As conversões obtidas em butirato, hexanoato e octanoato de benzila foram de 88, 89, 91%, respectivamente. Para os ácidos de cadeia alquílica maiores de C12 até C18, tais como láurico, palmítico e esteárico as conversões foram menores, sendo de 39, 28 e 79%, respectivamente.

Para os ácidos citados acima observou-se que com o aumento da cadeia alquílica de C12 até C18 as conversões diminuíram provavelmente devido ao impedimento estérico da cadeia alquílica do doador acila.

Com o ácido cinâmico (**17**), que contém um anel aromático e uma dupla ligação conjugada ao grupo carboxila, não foi observada a formação do éster. Este resultado também pode estar relacionado ao impedimento estérico e ao efeito eletrônico da dupla ligação conjugada ao centro reacional.



De modo geral, os resultados aqui apresentados mostram a eficiência do processo de imobilização, considerado que estes sistemas podem ser reutilizados e possuem estabilidade frente a diversos solventes orgânicos. Um outro aspecto importante deste trabalho, é a versatilidade destes biocatalisadores imobilizados, pois inúmeros ésteres foram preparados com conversões na faixa de 12-95%.

5. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho são:

- ✓ Os filmes obtidos com a blenda de DEX/PVA/plastificante formaram filmes consistentes e maleáveis, podendo assim ser utilizados como suportes na imobilização de lipases.
- ✓ Os filmes de DEX/PVA mostraram-se estáveis em solventes orgânicos de diferentes polaridades.
- ✓ A quantidade de água presente nos filmes com e sem LPS variou de 7-13%, contribuindo para a manutenção da atividade catalítica da enzima.
- ✓ Ao utilizar lipases de diferentes procedências imobilizadas em DEX/PVA/S ou DEX/PVA/G, o acetato de benzila foi obtido com conversões de 13-95%.
- ✓ Os sistemas DEX/PVA/S, e DEX/PVA/G foram reutilizados, e o acetato de benzila foi obtido com conversões similares a primeira utilização, sendo 12-94%.
- ✓ A estocagem dos filmes de DEX/PVA e posterior reutilização, demonstrou que a atividade catalítica das lipases imobilizadas manteve-se inalterada.
- ✓ A reação de obtenção dos alcenoatos de benzila foi dependente da cadeia alquílica do ácido e da massa de lipase. Os melhores resultados foram obtidos utilizando 50mg de LPS imobilizadas em filmes de DEX/PVA/S. O acetato de benzila e hexanoato de benzila foram obtidos com conversões de 95 e 91%, respectivamente em 72h.

Sendo assim, a utilização de filmes de DEX/PVA/plastificante como suporte para imobilização de lipases mostrou-se ser muito vantajosa, devido a possibilidade de estocagem e reutilização do biocatalisador suportado. Além disso, o material empregado é biodegradável, contribuindo assim para a chamada “química verde”.

7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, propõem-se as seguintes sugestões para dar continuidade ao trabalho.

- Utilizar lipases de outras procedências imobilizadas nestes suportes.
- Avaliar a influência de outros solventes orgânicos nas reações de transesterificação e esterificação.
- Avaliar a influência do tempo da reação de obtenção em acetato de benzila.
- Imobilizar duas lipases simultaneamente no mesmo suporte, o método chamado de “coquetel enzimático”.

8. REFERÊNCIAS

- 1-Campbell, M. K. Biochemistry **1995**, Saunders College Publishing, 169.
- 2-Bezbradica, D.; Mijin, D.; Siler-Marinkovic, S.; Knezevic, Z.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, 45, 97-101.
- 3-Palmer, T. Understanding Enzymes **1995**, Prentice Hall-Ellis Horwood, 67-75.
- 4-Faber, K.; Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag, New York, **1997**.
- 5-Voet, D.; Voet, J.G., Pratt, C. W.; Fundamentos de Bioquímica. Ed. Artmed, Porto Alegre, **2000**.
- 6-Nelson, D. L.; Cox, M. M. Lehninger: Principles of Biochemistry **2000**, 3rd Ed., Worth Publishers, Cap.5, 113-290.
- 7-Carvalho, O. P.; Calafatti, S.A.; Marassi, M.; Da Silva, D. M.; Contesini, F. J.; Bizaco, R. *Quim. Nova* **2005**, 28, 4, 614-621.
- 8- Roberts, S.M., Biocatalysis for fine Chemical Synthesis, John Wiley & Sons, Ltda England, **1999**.
- 9-Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39, 235-251.
- 10-Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. *Biotechnol. Adv.* **2001**, 19, 627-662.
- 11-www.rcsb.org/pdb/. Acessada em novembro de 2008.
- 12-Yadav, G. D.; Dhoot, S. B.; *J. Mol. Catal. B: Enzym. in press*, **2008**.
- 13-Pavia, D. L.; Lampman G. M.; Kriz, G. S. Introduction to *Organic Laboratory Techniques* 3rd Ed., pág. 87.
- 14-Chang, S.W.; Shaw, J.F.; Shieh C.H.; Shieh, C.J.; *J. Agric.Food Chem.* **2006**, 54, 7125-7129.
- 15-Sebrão, D.; Silva, V. D.; Nascimento, M. G.; Moreira, M. A. *Quim. Nova*, **2007**, 30, 5, 1182-1187.
- 16-Sheldon, R. A.; Schoevaart, R.; Van Langen, L. M.; *Biocatal. Biotransform.*, **2005**, 23, (3-4), 141-147.
- 17-Wang, Y.; Xu, J.; Hu, Y.; Luo, G.; Dai, Y.; *J. Mem. Sci.*, **2006**, 281, 410-416.
- 18-Fehér, Y.; Illeová, V.; Kelemem-Horváth, I.; Bélafi-Bakó, K.; Polakovic, M.; Gubicza, L. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, 50, 28-32.

- 19-Bobbio, F. O., Bobbio, P. A.; Introdução à Química de Alimentos, Fundação Cargill, 50-60, 81-82, **1985**.
- 20-<http://www.foodnews.ch/x-plainmefood/20-lebensmittel/Dextran.html>
acessado em 28 de novembro de **2008**.
- 21-<http://faculty.uscupstate.edu/llever/Polymer%20Resources/Synthesis.htm#step>
, acessado em 1 de dezembro de 2008.
- 22-Million, L. E., Guhados, G., Wan, W., *J. Biomed. Mat. Res. Part B App. Biomat.* **2008**, 86B. 2, 444-452.
- 23-Park, H.; Y.Oh, K. S.; Koo, H. M.; Cho, S. H.; Chung, S. J.; Lim, Y. T.; Kim, D.; Yuk, S. H.; *J. Microencap.*, **2008**, 25, 2, 106-110.
- 24-Mendieta-Taboada, O.; A. de Carvalho, R.; Sobral, P.J.A.; *Quím. Nova*, **2008**, 31(2), 384-393.
- 25-Laane, C.; Boeren, S.; Veger, C.; *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, 30, 81.
- 26-Morita, T. Assumpção. R. V.; *Manual de soluções, Reagentes e Solventes.*; editora Edgard Blücher Ltda. 2ª Ed., **1995**, 316.
- 27-Villeneuve, P.; Muderhawa, J.M.; Graille, J.; Hoss, M.J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 9, 113.
- 28-Pleiss, J.; Ficher, M.; Schmid, R.D.; *Chem.Phys.Lipids*, **1998**, 93, 67.
- 29-Moreira, M. A.; Nascimento, M. G.; *Catal. Comm.* **2007**, 8, 12, 2043-2047.
- 30-Bitencourt, T. B.; Nascimento, M. G.; *Chemo-enzymatic synthesis of N-alkyloxaziridines mediated by lipases and urea-hydrogen peroxide.*; *Green Chem.*, aceito para publicação, **2008**.

9. ANEXOS

Preparação do acetato de benzila com lipases imobilizadas em filme de Dextrana/PVA

André Possamai Rosso* (IC) e Maria da Graça Nascimento (PQ)

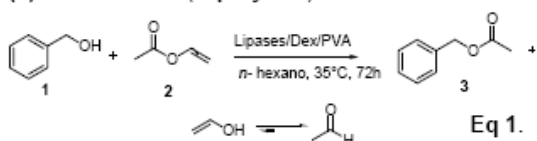
Departamento de Química UFSC- Florianópolis, SC 88040-900 * e-mail: possamairosso@yahoo.com.br

Palavras Chave: lipases, polímeros, transesterificação

Introdução

As lipases são enzimas que catalisam as reações de hidrólises estão presentes em diversos tipos de organismos incluindo animais, plantas, fungos e bactérias.¹ As lipases são usadas como catalisadores em reações de esterificação e transesterificação e na hidrólise de triglicerídeos. Estes estão sujeitos à inativação em meio orgânico, por fatores químicos, físicos, ou biológicos. Visando protegê-los das interações com o solvente orgânico, têm sido desenvolvidas diversas técnicas de imobilização.^{1,2,3}

As dextranas (SIGMA) constituem de um grupo de polissacarídeos estruturalmente relacionados entre si formadas por unidade de D-glicose, obtido do microorganismo *Leuconostoc mesenteroides*; e o poli-álcool vinílico-PVA (VETEC) é um polímero sintético. Neste trabalho, filmes de Dextrana/PVA foram preparados e utilizados para a imobilização das lipases de *Pseudomonas* sp. (LPS, Amano, 30.000u/g), *Rhizopus oryzae* (F-AP15, Amano, 150u/mg), *Candida rugosa* (AY, Amano 30.000u/g) e de *Mucor javanicus* (M, Amano, 10.000u/g). Estes sistemas foram usados como catalisadores na obtenção do acetato de benzila (3) a partir do álcool benzílico (1) e do acetato de vinila (2) em *n*-hexano. (Equação 1)



Resultados e Discussão

Primeiramente foram realizados diversos testes variando as massas de dextrana (0,0-1,0g) PVA (0,0-1,0g) e do plastificante (sorbitol e/ou glicerol (0,0-0,25g)), a fim de obter um filme resistente e maleável. As blendas formadas com 0,15g de dextrana, 0,85g de PVA e 0,2g de sorbitol ou glicerol apresentaram uma melhor consistência e maleabilidade. Portanto, estas quantidades foram utilizadas para a imobilização das lipases AY, LPS, F-AP15, M. Estes sistemas foram utilizados como catalisadores nas reações de transesterificação entre o acetato de vinila (5 mmol) com o álcool benzílico (5 mmol) em *n*-hexano (25mL), 35°C, por

72h. As conversões em produto, foram determinadas por RMN-¹H (400MHz), e estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Conversões do acetato de benzila catalisadas por lipases imobilizadas em blendas poliméricas de dextrana/PVA.^(a)

| Lipases | Conversões ^(b) (%) | |
|---------|-------------------------------|---------------------------|
| | Dextrana/PVA/ Glicerol | Dextrana/PVA/ Sorbitol |
| LPS | 92,0 | 95,0 |
| AY | 29,0 | 14,2 |
| F-AP15 | 22,8 | 53,6 |
| M | 26,2 | 12,5 |

(a) 50 mg de lipases, 5 mmol dos substratos, 0,15g de Dextrana, 0,85g de PVA, 0,2g de glicerol ou sorbitol, 35° C, 72h. (b) determinada por RMN-¹H.

De acordo com a Tabela 1, pode-se observar que com a LPS imobilizada em blendas de dextrana/PVA tanto com glicerol ou sorbitol obteve-se as maiores conversões em éster, sendo de 92 e 95%, respectivamente.

Com a lipase F-AP15, a conversão obtida com a blenda dextrana/PVA/sorbitol foi maior que com dextrana/PVA/glicerol, sendo de 53,6% e 22,8%, respectivamente. Com as outras lipases as conversões variaram de 14,2 a 29%, independente do plastificante.

Conclusões

As blendas poliméricas formadas com dextrana/PVA/plastificante mostraram-se eficientes para a imobilização das lipases.

As maiores conversões em acetato de benzila foram obtidas com LPS imobilizada em dextrana/PVA/sorbitol e dextrana/PVA/glicerol

Agradecimentos

UFSC, CNPq, CAPES e Amano

¹ Faber, K.; Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag, New York, 1997.

² Karra-Châabouni, M.; Bouaziz, I.; Boufi, S.; Do Rego, A. M. B.; Gargoui, Y. *Colloids Surf., B* 2008, 66, 168-177.

³ Dalla-Vecchia, R.; Sebrão, D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Process Biochem.* 2005, 40, 2677-2682.